

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11017

研究課題名(和文) 口腔由来多剤耐性黄色ブドウ球菌の感染症予防法開発に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Fundamental research toward development of infection prevention against oral cavity-derived multidrug resistant *Staphylococcus aureus*

研究代表者

松尾 美樹 (KAWADA-MATSUO, Miki)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：20527048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多剤耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の口腔内定着阻害法開発に向けて、定着メカニズムと抗菌性因子探索の両方向からの研究により、MRSAの口腔内定着阻害法の開発を目指すことを目的とし、臨床分離株MRSAの性状解析と、MRSAの新規耐性機構解明の2つについて検討を行った。天然由来成分であるグリチルレチン酸(GRA)とサクシニル酸(GR-SU)がMRSAに対して抗菌力を発揮することを見出し、抗菌メカニズム解明を行った。また、乳酸菌由来バクテリオシンであるナisinをsub-MIC濃度作用させることにより生じた、新たなMRSAの薬剤耐性機構解明を行った。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop a method for inhibiting oral colonization of *Staphylococcus aureus* (Sa). We set up 2 researches both colonization mechanism and searching antibacterial factor toward development of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in oral cavity. We revealed that glycyrrhetic acid (GRA) and succinic acid (GR-SU) exerted antibacterial activity against clinical isolated MRSA. We discovered the novel drug resistance mechanism of MRSA by exposing sub-MIC concentration on nisin, a bacteriocin derived from lactic acid bacteria.

From these experiments, we discovered a novel naturally occurring antimicrobial substance effective for MRSA and a novel drug resistance mechanism of MRSA against antibacterial substances of bacteria, and it will be important to conduct fundamental research on inhibition of MRSA colonization in oral cavity in the future.

研究分野：口腔細菌学分野

キーワード：MRSA 口腔定着阻害 抗菌物質 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌 (Sa) は病原細菌として知られており、その薬剤耐性化の高さが院内感染菌 MRSA として知られている。一方 Sa はヒトの皮膚や粘膜に常在する細菌である。最も分離頻度の高い部位は鼻腔であるが、口腔からも分離される。口腔常在性 Sa は、皮膚や鼻腔常在性 Sa に比較し、誤嚥性肺炎や食中毒や菌血症・敗血症の起炎菌として注意が必要である。

このように Sa 感染症の対策は口腔領域への定着予防が重要であり、近年多剤耐性型 Sa の感染が広く認められることから、口腔内の黄色ブドウ球菌の活性抑制・排除というコントロールの重要性は高まるものと考えられ、特に高齢者・要介護者に対するコントロールの実践は必要不可欠である。

2. 研究の目的

多剤耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の口腔内定着阻害法開発に向けて、定着メカニズムと抗菌性因子探索の両方向からの研究により、黄色ブドウ球菌 (Sa) の口腔内定着阻害法の開発を目指すことが本研究の目的である。本研究は以下に説明する(1) 臨床分離株ならびに口腔・鼻腔から分離した Sa の性状解析、(2) 細菌由来抗菌性因子 (バクテリオシン) に対する MRSA の新規耐性機構解明について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 臨床分離株ならびに口腔・鼻腔から分離した Sa の性状解析

臨床分離株 50 株ならびに、ボランティア 377 名の口腔・鼻腔から Sa を 149 株分離し、抗菌剤感受性やゲノムパターン比較を行い、口腔に常在化する Sa の特徴の有無を検証した。

抗菌剤感受性は細菌由来抗菌性物質であるナイシンや、天然由来抗菌性物質であるグリチルレチン酸とその誘導物質について、最小発育阻止濃度(MIC)法を通報に準じて行った。

ゲノムパターン解析はシカジーニアス分子疫学解析 POT キット (関東化学株式会社) を用いた POT 法をマニュアルの方法に従って行った。

(鹿児島大学疫学研究等倫理委員会承認番号: 第 372 号)

(2) 細菌由来抗菌性因子 (バクテリオシン) に対する MRSA の新規耐性機構解明

乳酸菌由来バクテリオシンであるナイシンを sub-MIC 濃度作用させることにより生じ

た、新たな MRSA の薬剤耐性機構を見出し、その解明を行った。

解析方法は、マイクロアレイ解析による網羅的な遺伝子発現検証後、耐性候補遺伝子発現を定量性 PCR、抗体作製後ウェスタンブロット法にて遺伝子レベル、タンパクレベルで検証することで耐性遺伝子を確定し、不活性化株、不活性化遺伝子相補株を作製し、各種抗菌物質に対する感受性を MIC 法にて検証した。

(鹿児島大学遺伝子組み換え承認番号 25007, 25008)

4. 研究成果

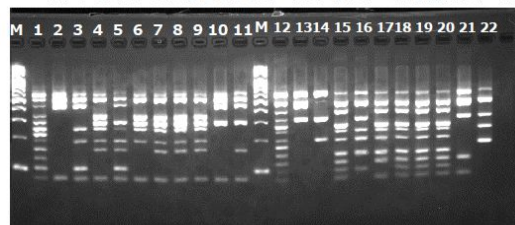
臨床分離株 50 株について、天然由来成分であるグリチルレチン酸ならびにその誘導物質の抗菌効果を検証した結果を下表に示す。臨床分離株は 19 株が MRSA, 31 株が MSSA であり、グリチルレチン酸 (GRA) とサクシニル酸 (GR-SU) が MRSA に対して抗菌力を発揮することを見出した。

	MIC (mg/L)									
	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	4096~
Dipotassium glycyrrhizate (GR-K)										
MRSA	0	0	0	0	2	0	3	4	7	3
MSSA	0	0	0	0	1	2	6	12	8	2
total	0	0	0	0	3	2	9	16	15	5
Diosodium 3-oxocycloxy beta-glycyrrhizate (GR-SU)										
MRSA	2	3	3	9	2	0	0	0	0	0
MSSA	1	2	11	5	12	0	0	0	0	0
total	3	5	14	14	14	0	0	0	0	0
Glycyrrhetic acid (GRA)										
MRSA	0	4	3	2	6	0	0	0	0	0
MSSA	1	0	3	5	7	15	0	0	0	0
total	1	4	7	8	9	21	0	0	0	0
Stearyl glycyrrhizate (GR-S)										
MRSA	0	0	0	0	1	2	2	4	1	9
MSSA	0	0	0	0	2	4	3	7	3	7
total	0	0	0	0	6	6	5	11	6	16
glycyrrhizyl stearate (GR-SA)										
MRSA	0	0	0	1	0	8	7	3	0	0
MSSA	0	0	2	2	4	7	6	5	3	2
total	0	0	2	3	4	15	13	8	3	2

詳細な解析から、GRA ならびに GR-SU は、Sa のアミノ酸取り込みに必要な ABC トランスポーター、生育を制御するレギュレーターである RNAlII、糖取り込み発現を抑制することで Sa 生育を阻害することを明らかにした。

POT 法を用いたゲノムパターン解析結果の一部を図に示す。ゲノムパターンは年齢や性差に関係なく多様性を持つこと、また 1 個人の口腔・鼻腔両方から Sa が分離された際、一部の被験者から分離された口腔由来 Sa、鼻腔由来 Sa 各々のゲノムパターンが異なる、つまり常在部位の違いにより異なる菌株を認めた。ここから口腔由来 Sa に特有のゲノムパターンの有無を現在解析中であり、口腔定着に重要な因子の同定を引き続き行う予定である。

POT法による口腔・鼻腔から分離したSaのゲノムパターン解析結果 (一部)



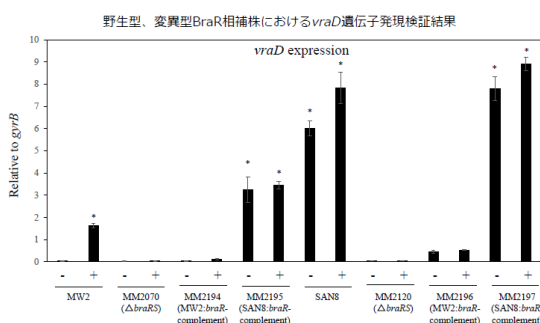
M: marker

さらに、分離した Sa の各種抗菌物質感受性試験を行っており、これらの結果と POT

法によるゲノムパターン解析の結果から、薬剤感受性の違いを規定するゲノムパターンを見出し、薬剤耐性の強いゲノムパターンを示した Sa 株の前ゲノム解析を行い耐性化を規定する因子の同定を試みている。

一方、乳酸菌由来バクテリオシンであるナイシンを sub-MIC 濃度作用させることにより生じた、新たな MRSA の薬剤耐性機構を見出し、その解明を行った。

解析方法は、マイクロアレイ解析による網羅的な遺伝子発現検証により、ナイシン耐性に関与する ABC トランスポーター-VraDE 発現の上昇を認めた。VraDE ABC トランスポーターは、外環境応答制御系因子で低濃度ナイシン耐性に関与する二成分制御系因子 BraRS の制御下にあることから、BraRS のシーケンス解析を行った。その結果、BraRS のプロモーター領域、braR coding region に点変異を求めた。そこで遺伝子欠損株ならびに相補株を作製し vraD 遺伝子発現を定量性 PCR にて、ナイシン感受性試験を MIC 法にて検証した。その結果、点変異を起こした braR を Sa 野生株の braRS 領域不活性化株に導入した相補株では、野生型 braR を導入した相補株と比較し vraD 発現の上昇(下図)ならびにナイシン MIC の上昇を認めた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Antibacterial Effects of Glycyrrhetic Acid and Its Derivatives on *Staphylococcus aureus*., Oyama K, Kawada-Matsuo M, Oogai Y, Hayashi T, Nakamura N, Komatsuzawa H., PLoS One., 7;11(11):e0165831, **2016, 査読有**
- (2) Lysine and Threonine Biosynthesis from Aspartate Contributes to *Staphylococcus aureus* Growth in Calf Serum., Oogai Y, Yamaguchi M, Kawada-Matsuo M, Sumitomo T, Kawabata S, Komatsuzawa H., Appl Environ Microbiol., 82(20), 6150-7, **2016, 査読有**

- (3) Two-Component Systems Involved in Susceptibility to Nisin A in *Streptococcus pyogenes*., Kawada-Matsuo M, Tatsuno I, Arii K, Zendo T, Oogai Y, Noguchi K, Hasegawa T, Sonomoto K, Komatsuzawa H., Appl Environ Microbiol., 82(19):5930-9, **2016, 査読有**
- (4) C55 bacteriocin produced by ETB-plasmid positive *Staphylococcus aureus* strains is a key factor for competition with *S. aureus* strains., Kawada-Matsuo M, Shammi F, Oogai Y, Nakamura N, Sugai M, Komatsuzawa H. Microbiol Immunol., 60(3):139-47, **2016, 査読有**
- (5) *Staphylococcus aureus* SrrAB Affects Susceptibility to Hydrogen Peroxide and Co-Existence with *Streptococcus sanguinis*., Oogai Y, Kawada-Matsuo M, Komatsuzawa H., PLoS One., 2016, 11(7):e0159768, **2016, 査読有**

〔学会発表〕(計 6 件)

有井かおる、松尾美樹、小松澤均、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のナイシン耐性株の解析、第 69 回日本細菌学会九州支部総会、2016 年 9 月 2 日、宮崎市

松尾(川田)美樹、小松澤均、Resistant mechanism of two-component system against nisin A in *Streptococcus pyogenes*., 第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 26 日、札幌市

Miki Kawada-Matsuo, Kentaro Oyama, Tetsuya Hayashi, Hitoshi Komatsuzawa、Antibacterial Effects of Glycyrrhetic Acid and Its Derivatives on *Staphylococcus aureus*., 第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月 21 日、仙台市

松尾(川田)美樹、小松澤均、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のナイシン耐性株の解析、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年 9 月 17 日、塩尻市

Miki Kawada-Matsuo, Survival strategy of Gram-positive bacteria, The 14th Japan-Korea international symposium on Microbiology 2018, 2018 年 3 月 28 日、福岡市

Kaoru Arii, Miki Kawada-Matsuo, Yuichi Oogai, Hitoshi Komatsuzawa, Analysis of nisin resistant strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, 第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 3 月 28 日、福岡市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松尾 美樹 (KAWADA-MATSUO, Miki)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授
研究者番号：20527048

(2)研究分担者

小松澤 均 (KOMATSUZAWA, Hitoshi)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授
研究者番号：90253088

大貝 悠一 (OOGAI, Yuichi)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教
研究者番号：40511259

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()